

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Антропов Денис Николаевич

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной научно-
квалификационной работы

Разработка систем детекции нуклеиновых кислот и
регуляция экспрессии генов с использованием белков
геномного редактирования семейства Cas

Направление подготовки	1.5 Биологические науки
Направленность	1.5.3 Молекулярная биология

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Лаборатории геномного редактирования ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г.Новосибирск

Научный руководитель: **Степанов Григорий Александрович**, кандидат химических наук, заведующий лабораторией геномного редактирования ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Технология мРНК-вакцин начала активно развиваться в начале нынешнего века и получила хороший стимул за счет развития технологий синтеза нуклеиновых кислот, расширения знаний о функционировании иммунной системы человека и успехов в синтезе вариантов молекул-доставщиков. Технология мРНК-вакцин была экстренно внедрена в борьбе с новой коронавирусной инфекцией и получила широкое признание за счет возможности проведения массовой вакцинации. Однако фундаментальные аспекты исходного конструирования структуры и функционирования мРНК в организме человека и животных остаются не до конца изученными. Иммунизация на основе РНК для профилактики инфекционных заболеваний считается привлекательной альтернативой традиционным вакцинам. РНК вызывает эффективный защитный иммунный ответ против различных патогенов и обладает целым рядом преимуществ по сравнению с аттенуированными и инактивированными вакцинами, а также вакцинами других форматов на основе НК. В частности, РНК неинфекционна, не интегрируется в ДНК, и в силу быстрой деградации в клетке активность РНК ограничена. РНК можно вводить повторно как для запуска, так и для усиления иммунного ответа. Кроме того, РНК взаимодействует с TLR-рецепторами в клетке-хозяине, тем самым усиливая ответ на кодируемый иммуноген.

Для обеспечения структуры мРНК, наиболее эффективной в трансляции в эукариотических клетках, к последовательностям мРНК добавляют различные 5'- и 3'-UTR последовательности из клеток модельных организмов. Наиболее часто используемыми при этом являются нетранслируемые последовательности гена человеческих α - и β -глобина [1], последовательности, основанные на IRES-элементах различных вирусов [2,3]. Добавление данных элементов в структуру мРНК позволяет поддерживать стабильность мРНК и их высокий уровень экспрессии, в частности за счет взаимодействия 5'- и 3'-элементов друг с другом [4]. Это способствует многократному увеличению уровня трансляции по сравнению с исходными последовательностями, что очень важно для образования достаточного уровня антител после введения препарата в организм. Перспективным направлением является поиск комбинаций регуляторных последовательностей с помощью методов машинного обучения, что позволяет определять влияние абсолютно новых нетранслируемых последовательностей на регуляцию экспрессии мРНК.

Несмотря на большие достижения в оптимизации нуклеотидного состава мРНК и их последовательности, для их успешной таргетной доставки в конкретные клетки и ткани

важна также оптимизация молекул-доставщиков. Эти соединения в комплексе придают мРНК оптимальную структуру и компенсируют естественный заряд нуклеиновых кислот [5], который может оказаться цитотоксичным и привести к нежелательным побочным эффектам на разных уровнях организации живых систем. Для получения мРНК-вакцин чаще всего используются соединения липидной либо полисахаридной природы, что связано с их высоким сродством к клеточной мембране и, как следствие, высокой проницаемостью. Соединения липидной природы входят в состав липидных наночастиц (LNPs), создающих плотную сферическую оболочку вокруг нуклеиновой кислоты. Среди соединений липидной природы, которые могут входить в состав липидных наночастиц, известны DOTMA, DOTAP, PLGA, и тд [6], являющиеся липофильными катионными частицами и в силу этого компенсирующими отрицательный заряд РНК и свободно транспортируемыми через билипидный слой. Более устойчивыми и эффективными на сегодняшний день признаны липидные наночастицы, содержащие ионизируемые липиды, меняющие заряд при изменении рН в клеточной среде на кислотный, что позволяет им становиться неустойчивыми для РЭС [7]. Трудоемким аспектом в подборе доставщиков любой природы является необходимость каждый раз подбирать оптимальное соотношение (мРНК:молекула-доставщик) для эффективного образования комплексов, с возможностью их обратимого распада в клетке с таргетным высвобождением действующих агентов.

Важно отметить, при возникновении новых, потенциально пандемических штаммов патогенов, огромное значение приобретает скорость изготовления новой вакцины, и РНК-вакцины обеспечивают быстрое, экономичное, масштабируемое производство без использования клеточного и животного материала. Таким образом, РНК конструкции могут облегчить создание вакцин и потенциально обеспечить быстрый ответ на возникающие инфекции. Не менее важным этапом исследования будет анализ вариантов катионных липидов для доставки мРНК в клетки и в ткани живых организмов. Выбор наиболее эффективной комбинации структуры мРНК и липидного доставщика позволит провести исследования протективной способности таких препаратов на модели мышей.

Для определения свойств определенного доставщика в комплексе с РНК при доставке *in vitro* или *in vivo*, в качестве модели используются мРНК репортерных генов, в частности, относятся гены люциферазы (люцифераза светлячка), зеленого флуоресцентного белка (GFP) и красного флуоресцентного белка (mKate) [8]. позволяющих проводить детекцию с получением четко дифференцированного сигнала и без использования дорогостоящих реагентов. Репортерные гены применяются в

генетической инженерии в комбинации с целевыми генами в качестве селективных маркеров, для изучения доставки нуклеиновых кислот в органы, ткани. С их помощью возможно выявить силу промоторов, эффективность сигналов инициации трансляции и тд. В частности, репортерные гены используются для определения влияния структурных элементов мРНК на эффективность экспрессии в клетках человека. Уровень регистрируемого флуоресцентного или люминесцентного сигнала напрямую коррелирует с уровнем экспрессии гена и накоплением целевого белка. В экспериментах *in vivo* с помощью регистрации сигнала вследствие экспрессии мРНК репортерных генов возможна визуализация места доставки мРНК *in vivo* [9].

По результатам подбора условий введения и формирования липоплексов и их доставки *in vivo* и *in vitro* на модели репортерных мРНК, можно сделать определенные выводы о подборе условий получения липоплексов для доставки вирусных РНК [1]. Интересным с точки зрения научной значимости является сравнение протективного действия индивидуальной мРНК, кодирующей гемагглютинин (НА) и вариантов композиции мРНК НА с мРНК белков NP и M1 – экспрессия структурных белков вируса гриппа может обеспечить более эффективный клеточный иммунный ответ.

Цель и задачи исследования.

- **Цель** - разработка стратегии синтеза и доставки функциональных мРНК со структурой, обеспечивающей эффективную трансляцию.
- **Задачи:**
 - 1) Определить структуру мРНК, оптимальную для эффективной трансляции в клетках млекопитающих;
 - 2) Определить физико-химические характеристики изолированных катионных липосом 2X3-DOPE и 2X7-DOPE и липоплексов с мРНК, сформированных при разных соотношениях N/P;
 - 3) Выявить оптимальные концентрации мРНК и липосом для эффективной доставки и трансляции в клетках человека и мыши;
 - 4) Провести сравнительный анализ катионных липосом 2X3-DOPE и 2X7-DOPE в качестве доставщиков мРНК в клетки млекопитающих.

Научная новизна.

В ходе данной работы были исследованы новые комбинации 5'- и 3'-нетранслируемых областей, а именно 5'-UTR-4, сконструированная с помощью методов машинного обучения, как область, содержащая кодоны-оптимизированные для сборки на ней рибосомы и трансляционного аппарата, а также 3'-UTR AES-mtRNR1 – гибридная нетранслируемая область, состоящая из нетранслируемой 12S рРНК, кодируемой в митохондрии, и элемента, кодирующего энхансер андрогенного рецептора [10]. Также оценена эффективность нового доставщика липидной природы – 1,30-бис(холест-5-ен-3β-илоксикарбиламино)-9,13,18,22-тетрааза-3,6,25,28-тетраоксатриоконтан тетрагидрохлорида (2X7) – в разных соотношениях с липидом-хелпером DOPE и в сравнении с известными аналогами. В рамках работы была выбрана система доставки модельных репортерных мРНК на основе эффективных липосомальных комплексов, способных трансфицировать эукариотические клетки *in vitro* и *in vivo*.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В данной работе проведен сравнительный анализ влияния стандартно используемых для повышения экспрессии мРНК 5'- и 3'-нетранслируемых областей β-глобина и новой комбинации 5'- и 3'- нетранслируемых областей в составе структуры мРНК на экспрессию этих мРНК *in vivo* и *in vitro*, а также выявлены, синтезированы и проанализированы новые варианты доставщиков липидной природы. Результаты использования новых нетранслируемых областей в структуре мРНК, в комбинации с новыми таргетными доставщиками, могут позволить увеличить эффективность противовирусной мРНК-терапии и помочь в борьбе с появляющимися штаммами инфекций человека.

Личный вклад автора

Все основные эксперименты были выполнены автором самостоятельно. Катионные липосомы, использованные в работе, были синтезированы в Институте тонких химических технологий РАН под руководством д.х.н. Маслова М.А. Экспериментальная работа с модельными животными была проведена совместно с к.б.н. Марковым О.В. и к.б.н. Гладких Д.В. Цитометрический анализ клеточных культур после трансфекции проводился совместно с сотрудником лаборатории геномного редактирования ИХБФМ СО РАН Дюме А.С.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, к.х.н. Григорию Александровичу Степанову за помощь в планировании экспериментальной части работы, к.б.н. Олегу Владимировичу Маркову и к.б.н. Данилу Викторовичу Гладких за помощь в проведении экспериментов *in vivo*, Антону Сергеевичу ДOME и Анастасии Михайловне Матвеевой за помощь в экспериментах с клеточными культурами, Антону Сергеевичу ДOME за получение плазмид, использованных в работе, Альмире Ринатовне Валитовой за аккуратность и ответственный подход к экспериментам в рамках работы по проекту, а также всему коллективу лаборатории геномного редактирования ИХБФМ СО РАН за помощь и поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

***In Vitro* Транскрипция**

мРНК, использованные в работе, были получены с помощью набора для *in vitro* транскрипции (Биолабмикс, Россия). Anti-Reverse Cap Analog (ARCA) (Биолабмикс, Россия) и псевдоуридинтрифосфат (Биолабмикс, Россия) были добавлены в реакционную смесь в ходе транскрипции для создания структуры РНК, повторяющей внутриклеточную. По окончании синтеза РНК, ДНК-матрицу разрушали с помощью ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific, США). Для полиаденилирования 3'-конца синтезируемой РНК, использовали поли(А)-полимеразу из *E. coli* (New England Biolabs, США). Очистку продуктов проводили с помощью набора для очистки на колонках DR-50 (Биолабмикс, Россия).

Измерение дзета-потенциала и размера липосом

Для анализа физических характеристик формируемых липоплексов использовали Malvern Nanosizer (Malvern Instruments Ltd, Great Britain). Липоплексы формировали путем смешивания в равных объемах (25 мкл) липосом и водных растворов РНК. Формирование липоплексов проводили при 25°C. Для стабилизации комплексообразования, липоплексы растворяли в 1 мл воды, очищенной от нуклеаз (DEPC H₂O). Для измерения физико-химических характеристик, 1 мл водного раствора липоплексов переносили в специализированную кювету для измерений. Размер и индекс полидисперсности (PDI) липоплексов измеряли в 3х биологических повторях путем динамического светорассеяния под углом 173° при температуре 25 °C. Обсчет вышеупомянутых параметров проводили с учетом 3х биологических повторов, данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Клеточные линии, использованные в работе

Клеточную линию HEK293T/17 приобретали у ATCC, CRL-11268. Клетки культивировали при 37°C в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂ в среде DMEM/F12 (1:1) с 10% бычьей фетальной сыворотки (FBS), 1х пируватом натрия, 1х Glutamax, 1х антибиотиком/антимикотиком, 1х NEAA (все реактивы производства Gibco, США).

Трансфекция клеточных культур

Трансфекцию проводили на модели клеточной линии HEK293T/17. Для этого, клетки культивировали для 60-70% плотности на среде, состав которой описан выше. Для

исключения деградации РНК в составе липоплексов нуклеазами, клеточную среду меняли на среду без FBS с промежуточной промывкой клеток 1xPBS. Для формирования липоплексов, РНК и трансфектант доводили до 25 мкл с помощью PBS с дальнейшим смешиванием. Для формирования липоплексов, смесь инкубировали в течение 20 минут. Смеси, содержащие липоплексы, добавляли к не содержащей FBS среде с клеточной культурой и проводили трансфекцию в течение 5 часов. По окончании трансфекции среду меняли на FBS-содержащую.

Проточная цитометрия

Трансфекцию мРНК mKate2 проводили по вышеописанному протоколу для 24х-луночного планшета. Спустя 24 часа после трансфекции клетки удаляли с поверхности лунок с помощью TrypLE (Gibco, США), центрифугировали в течение 5 минут при 500g, однократно промывали PBS и ресуспендировали в 1 мл PBS с 0.5% FBS. Для определения уровня экспрессии мРНК mKate2, производили настройки цитометра BD FACSCanto II (BD Biosciences, США) для анализа 10000 событий в каждом образце клеток.

Эффективность трансфекции по результатам проточной цитометрии определяли, основываясь на 2х параметрах – проценте трансфецированных клеток и средней интенсивности флуоресценции (MFI). Процент трансфецированных клеток был подсчитан как процент mKate2-положительных одиночных клеток. MFI был подсчитан как среднее для отобранной клеточной популяции. Результаты анализировали в программном обеспечении FlowJo и представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения на основе 3х биологических повторов.

Анализ люминесценции

Трансфекцию мРНК Fluc2 проводили по вышеописанному протоколу для 24х-луночного планшета. Спустя 24 часа после трансфекции, клеточную среду удаляли и добавляли 200 мкл холодного Luciferase Assay Buffer (25мМ Tris-HCl pH 7.8; 1% Triton-X100; 5мМ EDTA; 15мМ MgCl₂; 75мМ NaCl; 2мМ DTT; 2мМ ATP). Планшеты инкубировали при +4°C в течение 20 минут. После лизиса суспензию из каждой лунки центрифугировали в отдельных 1.5мл пробирках при +4°C, 12 000 g, 5 мин, затем 190 мкл каждого супернатанта переносили в новый 24хлуночный планшет. Уровень люминесценции (представленный в относительных единицах люминесценции - RLU) измеряли с помощью ClarioStar Plus (BMG Labtech, Германия) после добавления в лунки 10 мкл субстрата D-люциферина (D-luciferin Potassium Salt, GoldBio, США) с

концентрацией 3 мг/мл на лунку. Данные анализировали в BMG Labtech CLARIOstar MARS Software.

Гель-ретардация

Для определения способности липосом к связыванию РНК, проводили гель-ретардацию. Для этого растворы липосом 2X3 и 2X7 в PBS (15 мкл) смешивали с раствором РНК в PBS аналогичного объема. Растворы липосом доводили до определенного объема в зависимости от соотношения N/P. Для определения комплексообразования, образцы смешивали с 4х буфером для нанесения (Биолабмикс, Россия) и наносили на 1.5%-ный агарозный гель. Электрофорез проводили в течение 20 минут при 120 В, 200 мА с последующим анализом геля с помощью GelDoc XR+ (Bio-Rad Laboratories Inc., США).

***In vivo* эксперимент**

Для экспериментов *in vivo* использовали мышей линии BALB/c женского пола, в возрасте 2-4 недели. Для эксперимента мыши предварительно рассаживались по экспериментальным группам в отдельные клетки. Липоплексы из 10 или 30 мкг мРНК Luc2 и конкретного типа липосом формировали исходя из соотношения N/P=8/1 в PBS в качестве растворителя в течение 15 минут до инъекции мышам. Инъекции проводили внутримышечно в бедренную артерию. Спустя 4ч, 8ч, 24ч, 48ч, 72ч, 96ч, 120ч детектировали наличие экспрессии у мышей люциферазы путем введения им внутривенно 150 мкл D-люциферина с концентрацией 24 мг/мл. Для детекции люминесценции мышей мягко анестезировали с помощью изофлурана и спустя 15 минут после инъекции проводили визуализацию биолюминесценции с помощью IVIS Lumina II (Life sciences).

Результаты и обсуждение

Оптимизация синтеза и трансфекции мРНК в клетки человека и выявление структуры репортерных мРНК, необходимой для их эффективной трансляции

Для получения мРНК, кодирующих зеленый флуоресцентный белок (hMGFP), красный флуоресцентный белок mKate2 и люциферазу светлячка (FLuc) были синтезированы ДНК-матрицы, содержащие промотор РНК-полимеразы фага T7, требуемые последовательности генов, а также последовательности UTR, фланкирующие рамку считывания с 5'- и 3'- концов. В качестве исходных матриц для получения репортерных генов использовали плазмиду pCDH-EF1a-Luc2-IRESmKate2 [11] и phMGFP (Promega, США). Синтез РНК проводили с использованием метода транскрипции *in vitro*

Т7 РНК-полимеразой. Полученные РНК содержали модификации в виде псевдоуридина (полная замена уридина на псевдоуридин) и структуры кэпа на 5'-конце. Синтез мРНК включал также стадии обработки фосфатазой и ферментативного полиаденилирования (Рис. 2).

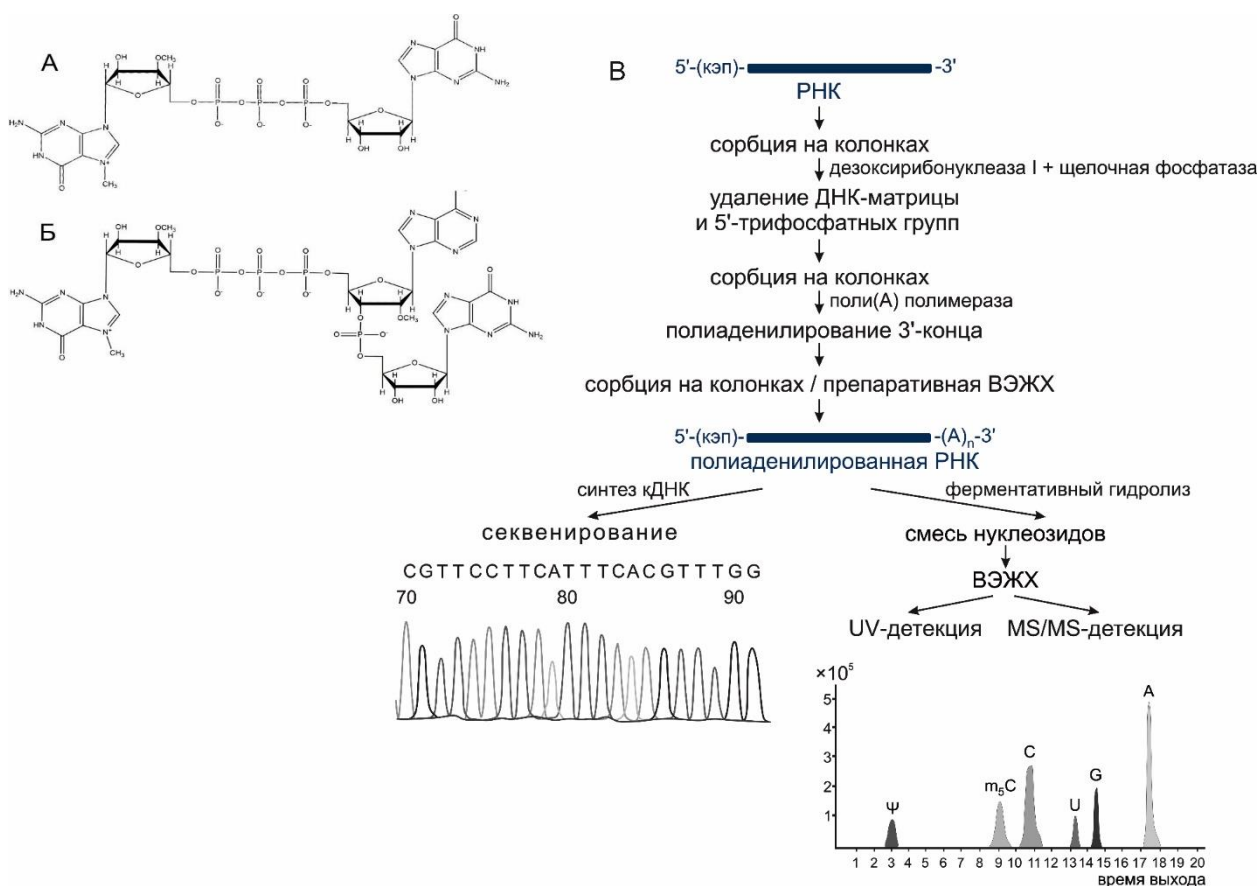


Рисунок 2. Структуры используемых аналогов структуры кэп: ARCA (А), кэп AG (m7GAmG, Б). В – Схема синтеза мРНК методом транскрипции *in vitro*, последующей очистки и анализа состава.

ДНК-матрицы были сконструированы и синтезированы в двух вариантах: для включения аналога кэпа ARCA и варианта кэпа AG (Рис. 2А, Б). Такие варианты матриц отличаются последовательностью нуклеотидов: для эффективного включения ARCA необходимы нуклеотиды GGG, следующие сразу за протомотором ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага Т7; для включения кэпа AG необходимы нуклеотиды AGG.

Для подтверждения функциональности полученной мРНК hMGFP проводили трансфекцию клеток НЕК293Т/17 и А549 с разными концентрациями в комплексе с коммерческим трансфицирующим агентом Липофектамин 3000. Было показано, что при трансфекции мРНК GFP в концентрации 0.5-8.0 мкг/мл удается детектировать флуоресценцию в клетках человека. По данным цитофлуориметрии при концентрации от 2.0 мкг/мл удавалось достичь 50 % GFP-положительной популяции (Рис. 3).

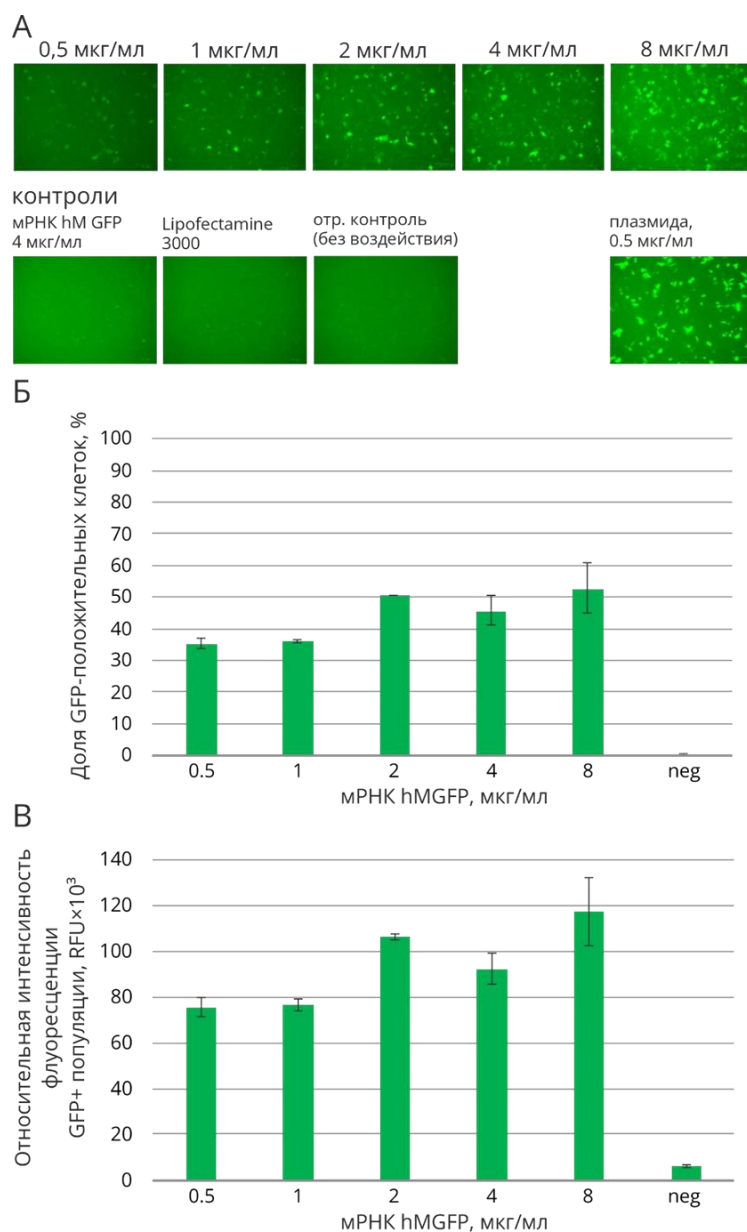


Рисунок 3. Оценка эффективности доставки и трансляции hMGFP после трансфекции клеток HEK293T/17 разными концентрациями мРНК (0,5-8,0 мкг/мл) с помощью Липофектамина 3000 методами микроскопии (А) и проточной цитофлуориметрии (Б, В).

Аналогичный эксперимент был проведен с мРНК mKate2. Было показано, что при трансфекции мРНК mKate2 в концентрации 0.5-8.0 мкг/мл удается детектировать флуоресценцию в клетках человека. По данным цитофлуориметрии при концентрации от 2.0 мкг/мл и выше удавалось достичь 70 % эффективности трансфекции. (Рис. 4)

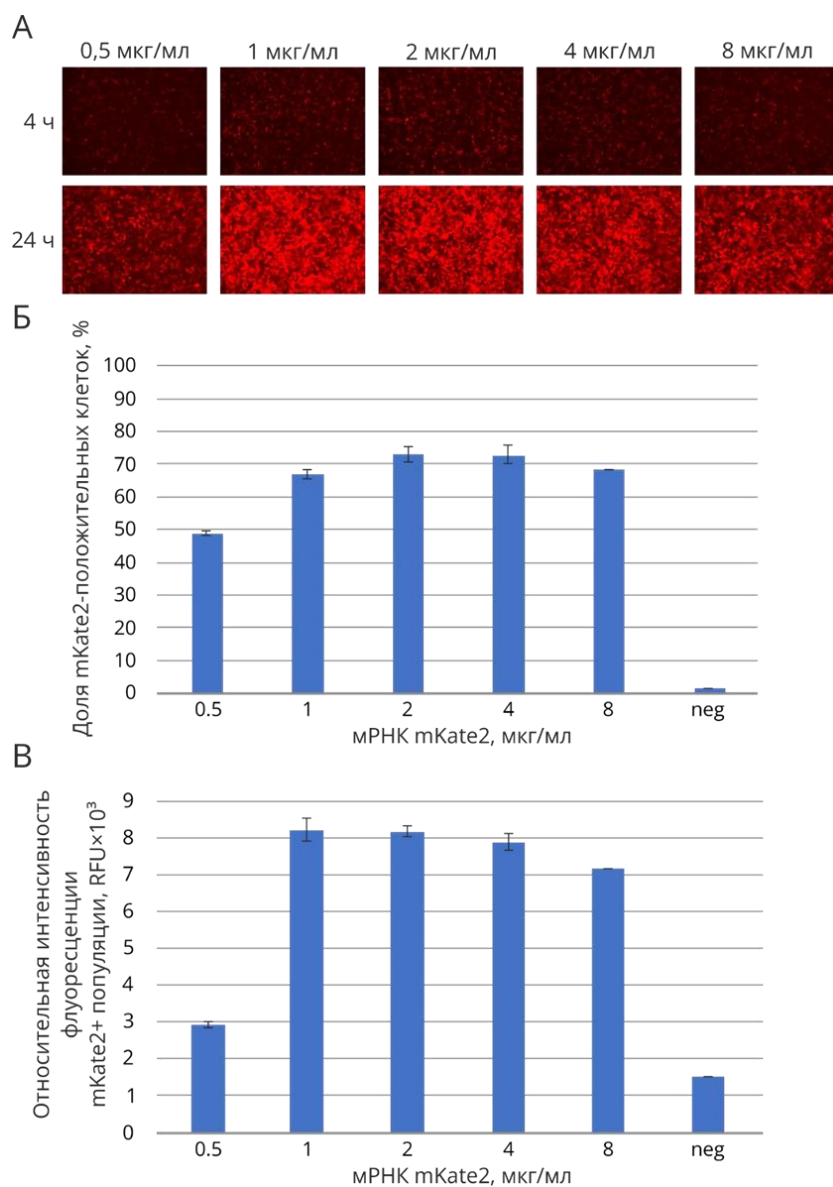


Рисунок 4. Оценка эффективности доставки и трансляции mKate2 после трансфекции клеток НЕК293Т/17 разными концентрациями мРНК (0,5-8,0 мкг/мл) с помощью Липофектамина 3000 методами микроскопии (А) и проточной цитофлуориметрии (Б, В).

На модели hMGFP проводили оценку влияния UTR на эффективность экспрессии целевого белка с искусственных мРНК в клетках человека. Было показано, что добавление UTR позволило повысить уровень экспрессии hMGFP после трансфекции клеток мРНК в два раза (Рис. 5).

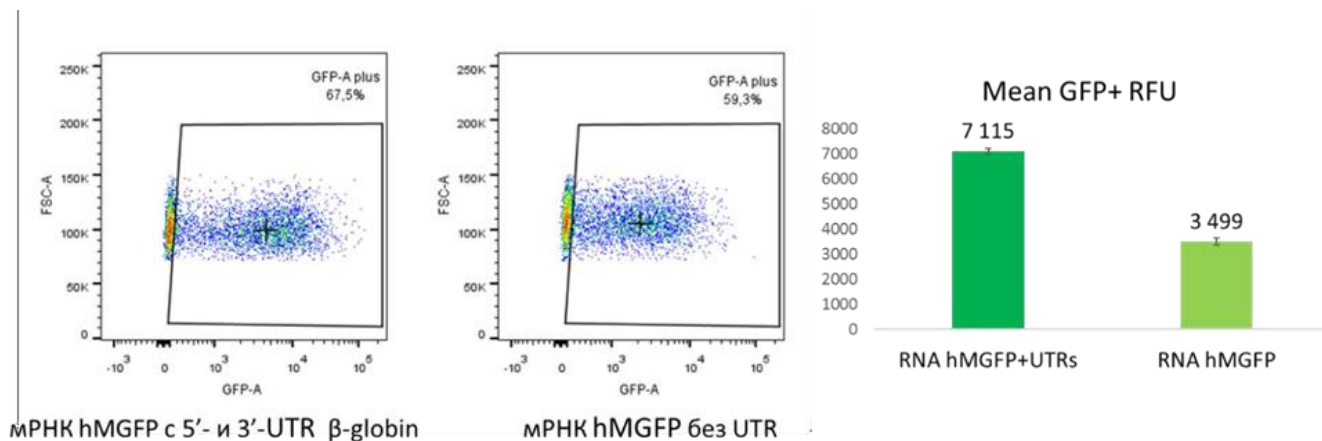


Рисунок 5. Оценка влияния UTR гена *HBB* на эффективность трансляции мРНК hMGFP в клетках человека методом проточной цитофлуориметрии.

В ходе экспериментов по подбору модификаций мРНК было установлено, что более эффективную трансляцию в клетках человека обеспечивает полное замещение уридина на псевдоуридин в последовательности мРНК. Также было показано, что ферментативное полиаденилирование обеспечивает эффективную экспрессию мРНК в клетках человека в отличие от короткого синтетического полиА-хвоста длиной до 60 нуклеотидов. Было показано, что отсутствие полиА-хвоста достаточной длины (порядка 150-200 н.) приводило к возникновению цитотоксического эффекта при трансфекции мРНК в клетки, который был обусловлен активацией каскада интерферонового ответа.

Определение физико-химических характеристик липидных доставщиков и их способности к формированию липоплексов с мРНК, обеспечивающих их эффективную экспрессию *in vitro*

В своем исследовании мы нацелены на расширение спектра катионных липосом, применяемых для доставки искусственных мРНК в клетки млекопитающих. За основу мы взяли описанные ранее в нескольких работах катионные липосомы 2X3:DOPE и 2X7:DOPE, которые представляют собой поликатионные амфифилы в комплексе с вспомогательным липидом [12,13]. Ранее были опубликованы данные, показывающие эффективность доставки плазмид, малых интерферирующих РНК, а также искусственных мРНК в клетки человека с помощью катионных липосом с разным соотношением 2X3 и DOPE [14-18].

В первую очередь, мы проанализировали физико-химические характеристики катионных липосом. Метод динамического светорассеяния был использован для оценки гидродинамических диаметров липосом и их дзета-потенциалов. Было установлено, что липосомы имеют размер в диапазоне 60-80 нм. При этом липосомы демонстрируют дзета-потенциал от 43 до 60 мВ.

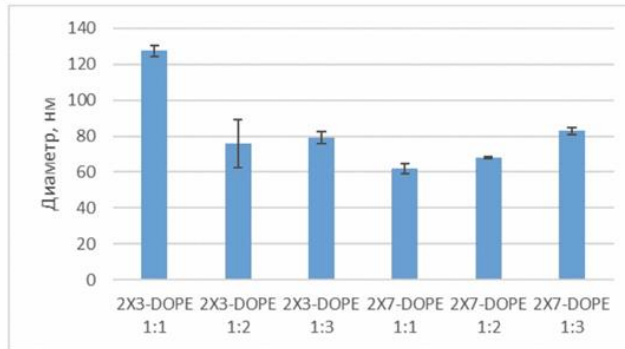
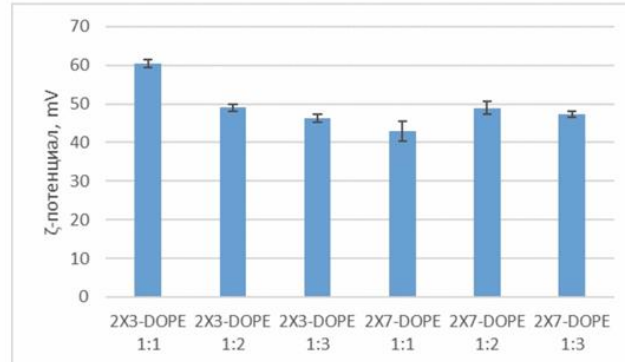
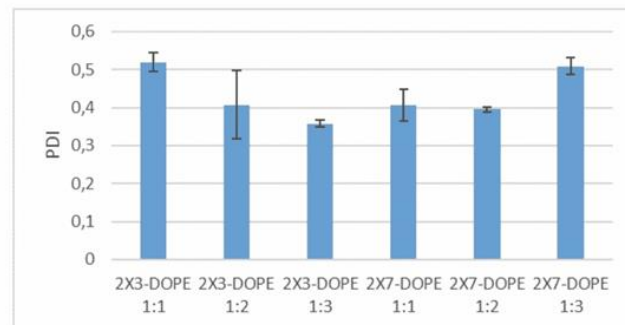
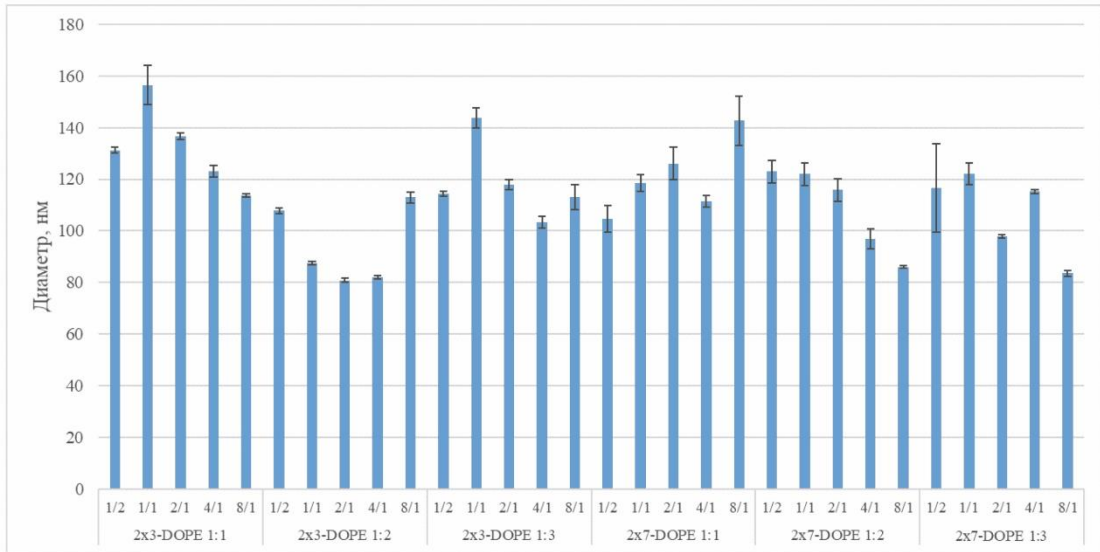
А**Б****В**

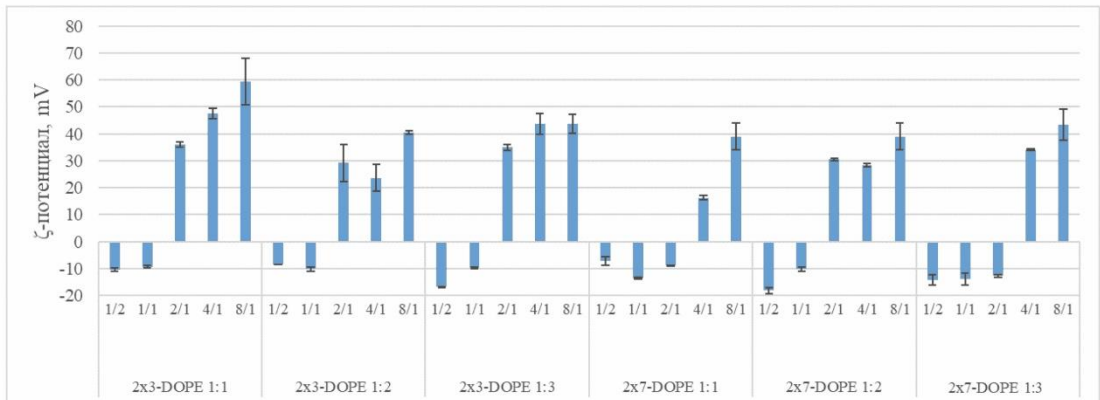
Рисунок 6. Оценка гидродинамического диаметра (А), ζ -потенциала (Б) и PDI катионных липосом (В). Данные представлены как среднее \pm SD.

Далее мы провели аналогичное исследование липоплексов, сформированных с мРНК при разных соотношениях N/P. Было установлено, что комплексы с мРНК, сформированные при N/P выше 2/1, имеют гидродинамический диаметр менее 150 нм (Рис. 6) Было показано, что заряд увеличивается с увеличением соотношения N/P. В диапазоне N/P больше 4/1 все липоплексы имели положительный заряд больше 20 mV.

А



Б



В

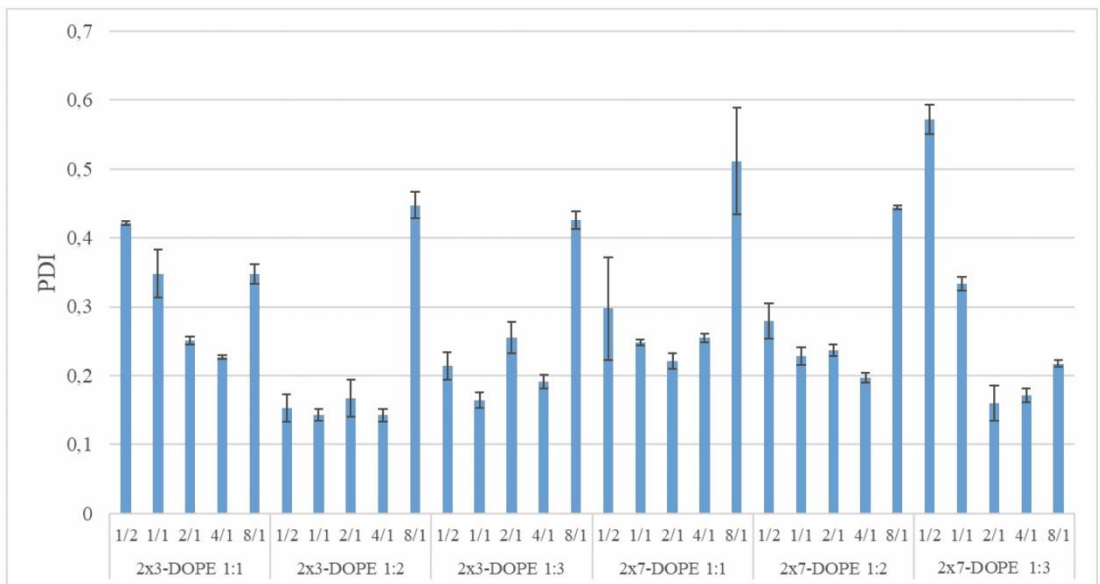
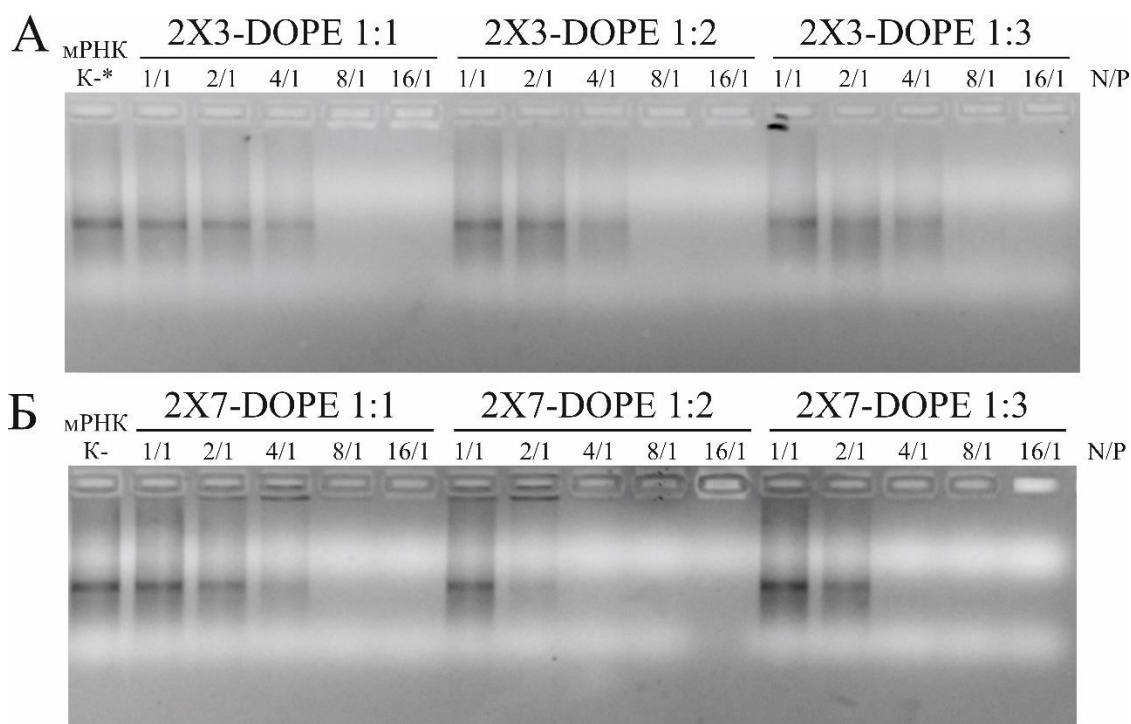


Рисунок 7. Оценка гидродинамического диаметра (А), ζ -потенциала (Б) и PDI (В) комплексов катионных липосом с мРНК. Данные представлены как среднее \pm SD.

Для оценки доли мРНК, включившейся в состав липоплексов при разных соотношениях N/P, проводили гель-ретардацию этих липоплексов и свободной мРНК в качестве контроля. При этом, наблюдали значительное изменение подвижности полос мРНК в геле для дорожек, соответствующих липоплексам с соотношением N/P более 4/1. Данный результат согласуется с результатами трансфекции мРНК в клетки человека, показывающей наибольшие уровни сигнала при этих соотношениях. Несмотря на изменение ζ -потенциала липоплексов уже для соотношения N/P=2/1, доля РНК в составе липоплексов является достаточно низкой.



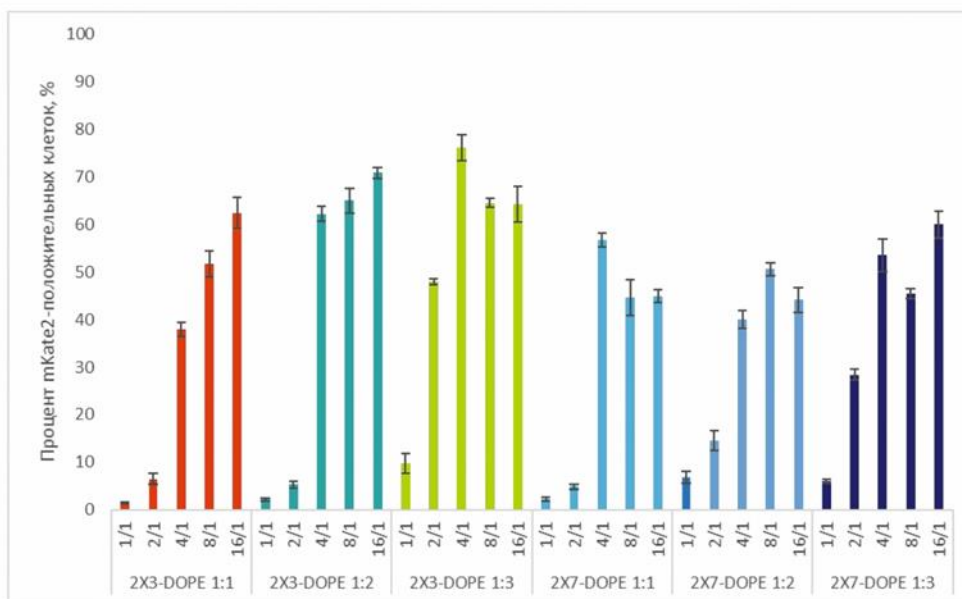
*мРНК К- - свободная мРНК без добавления липосом.

Рисунок 8. Гель-ретардация липоплексов, содержащих в своем составе липосомы 2X7 (А) и 2X3 (Б).

Далее мы проводили анализ эффективности доставки мРНК красного флуоресцентного белка mKate2 в клетки НЕК293Т/17 с помощью катионных липосом при разных соотношениях N/P. Было установлено, что при низких соотношениях N/P, при которых липоплексы имеют отрицательный ζ -потенциал, доставка мРНК происходит неэффективно. Доля эффективно трансфицированных клеток увеличивается с повышением N/P. Можно сделать вывод, что наиболее удачным является соотношение N/P 4/1, так как в таких условиях наблюдали высокую долю трансфицированных клеток и высокий относительный уровень флуоресценции mKate2. При N/P=16/1 наблюдали заметное снижение относительной флуоресценции в клетках, что по-видимому, было связано с цитотоксичностью липоплексов в таких условиях. Стоит отметить, что в

исследуемых условиях катионные липосомы 2X3-DOPE и 2X7-DOPE демонстрировали схожий уровень эффективности трансфекции клеток человека.

А



Б

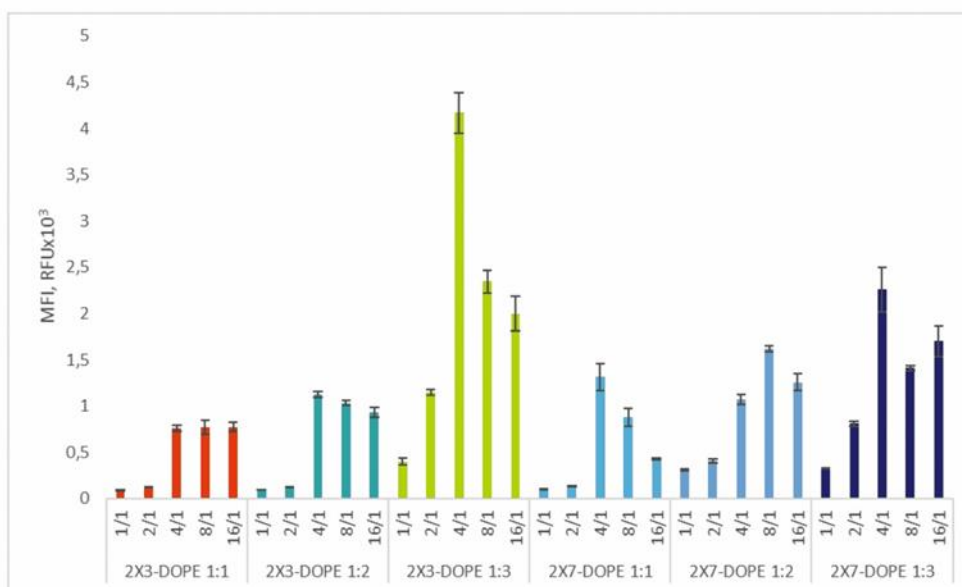


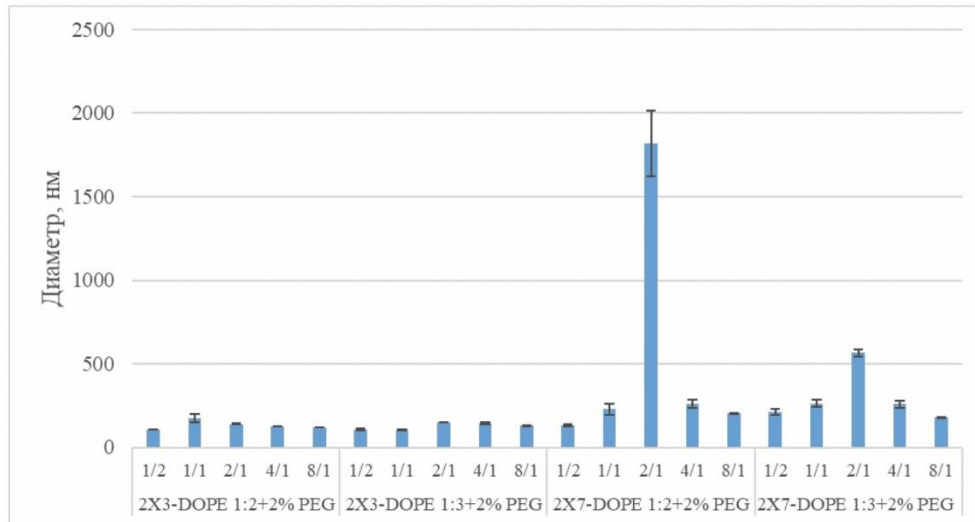
Рисунок 9. Эффективность доставки мРНК mKate2 катионными липосомами 2X3-DOPE и 2X7-DOPE при разных соотношениях N/P через 24 часа после трансфекции клеток НЕК293Т/17. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.

Оптимизация доставки мРНК репортерных генов в составе липоплексов для экспериментов *in vivo*

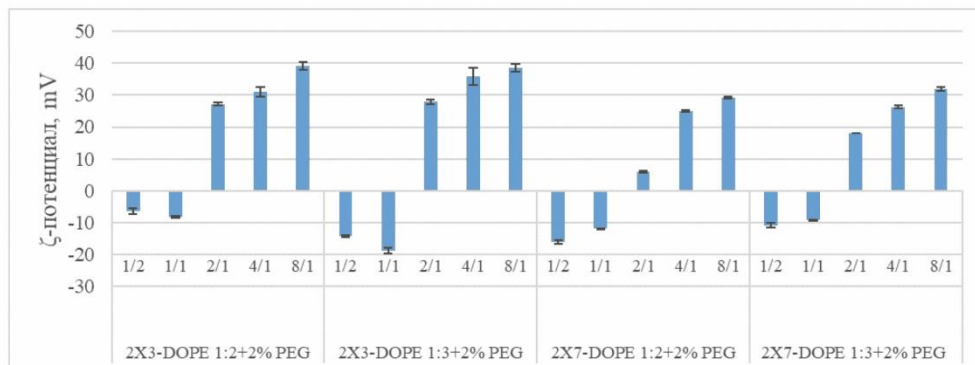
Таким образом, высокая эффективность трансфекции клеток липоплексами, содержащими 2X3 и 2X7 липосомы была подтверждена *in vitro*. Для наиболее эффективной доставки комплексов с РНК в условиях *in vivo*, мы использовали варианты вышеописанных липосом с PEG (полиэтиленгликолем). Согласно литературным данным,

липосомы с PEG демонстрируют меньший разброс в размере частиц, более высокую эффективность трансфекции в присутствии сыворотки и более продолжительное время циркуляции в кровотоке в сравнении с липоплексами без PEG [19]. Для подтверждения этих данных, мы в первую очередь оценили физико-химические свойства этих липосом в составе липоплексов (Рис. 10):

А



Б



В

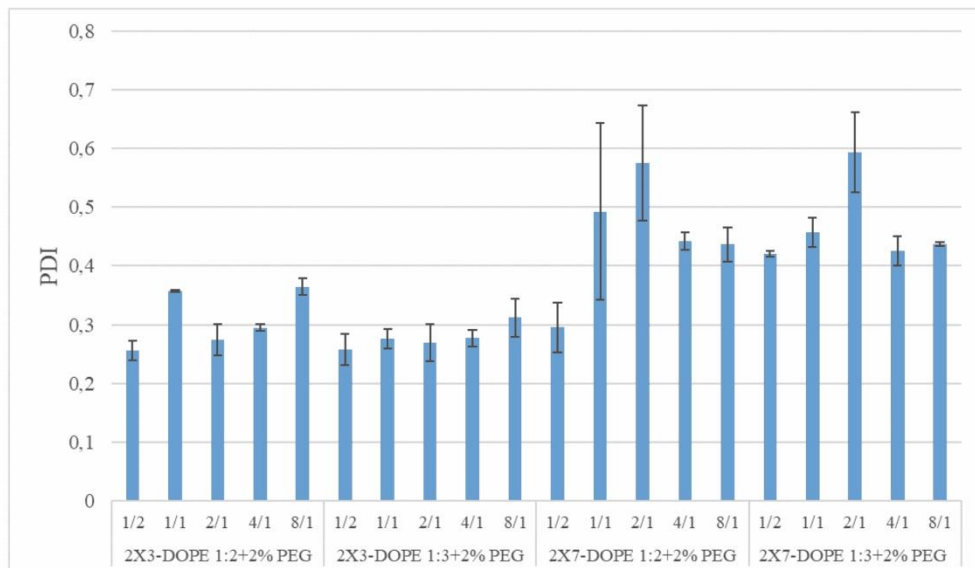


Рисунок 10. Оценка гидродинамического диаметра, ζ -потенциала и полидисперсного индекса (PDI) комплексов катионных липосом, содержащих 2% PEG, и мРНК. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Было выявлено, что физико-химические характеристики этих липосом для соотношения N/P, используемого нами для *in vivo* экспериментов (8/1), не практически не

отличаются от липоплексов, не содержащих PEG. Это может позволять данным липоплексам эффективно доставлять искусственные мРНК в условиях *in vivo*.

Для подтверждения эффективности этих липосом в доставке мРНК *in vivo*, был проведен ряд экспериментов по выявлению оптимального состава липосом в липоплексах и оптимальной структуры РНК для эффективной трансляции мРНК люциферы светлячка (mLuc2) *in vivo*; в качестве модельного животного использовали лабораторную мышь (*Mus musculus*).

На начальном этапе выявляли оптимальное соотношение основного липида в составе липосом к вспомогательному (DOPE; Рис. 11):

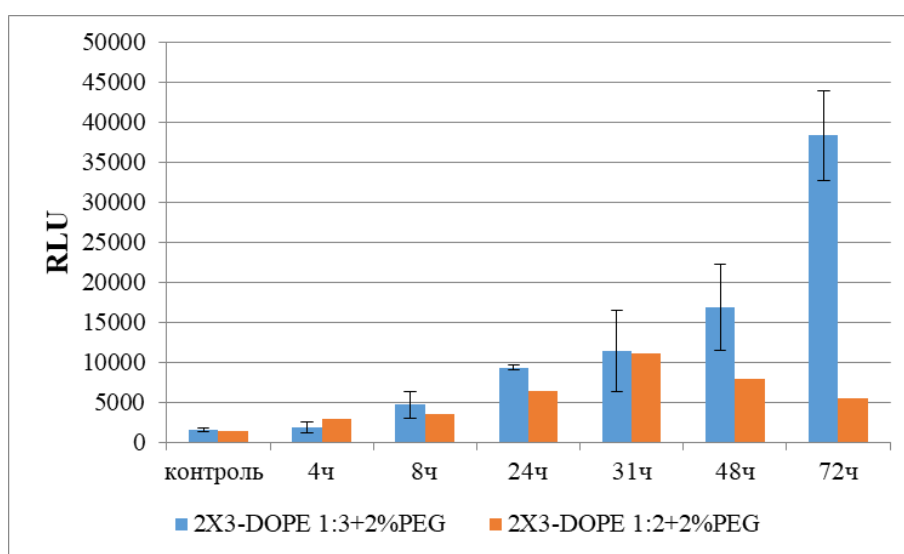


Рисунок 11. Сравнительный анализ доставки мРНК Luc2 *in vivo* для липоплексов, содержащих в своем составе липосомы 2X3-DOPE 1:2+2%PEG и 2X3-DOPE 1:3+2%PEG. Данные представлены как среднее±стандартное отклонение.

Анализ люминесцентного сигнала, полученного с помощью системы визуализации IVIS, показал, что липосомы 2X3-DOPE 1:3+2%PEG более эффективны в доставке мРНК *in vivo*, нежели 2X3-DOPE 1:2+2%PEG, и позволяют дольше проводить экспрессию мРНК. Это может говорить о том, что с увеличением концентрации вспомогательного липида DOPE в составе липосом увеличивается эффективность доставки мРНК в составе липоплексов и продолжительность ее экспрессии *in vivo*.

С использованием ранее подобранных липосом 2X3-DOPE 1:3+2%PEG формировали липоплексы, содержащие мРНК Luc2 с различными 5'- и 3'-UTR в их составе для выявления наиболее эффективной в экспрессии мРНК (Рис. 12):

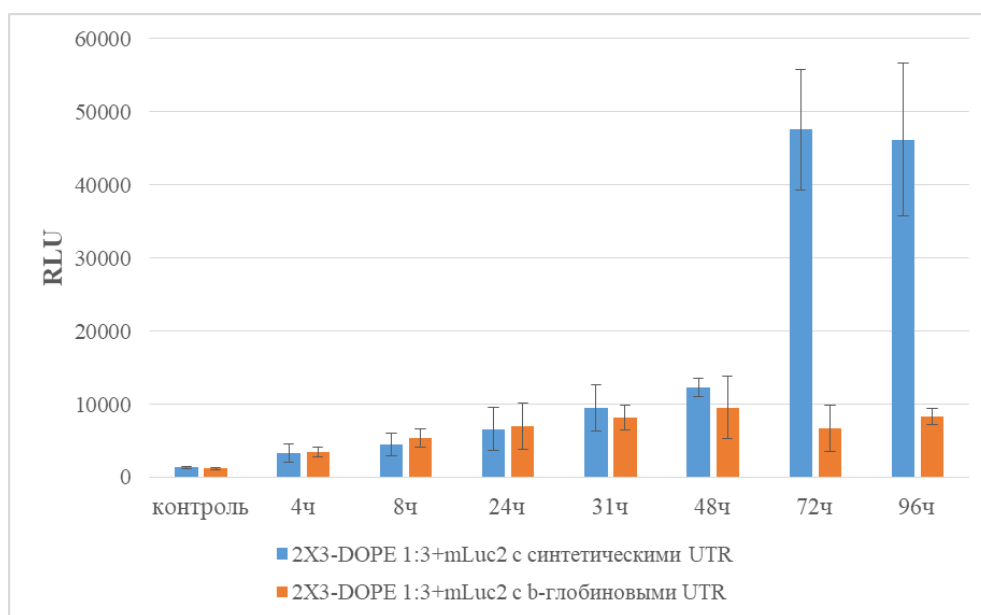


Рисунок 12. Сравнительный анализ доставки мРНК Luc2 с 5'- и 3'-UTR β -глобина человека и мРНК Luc2 с 5'UTR-4 – и 3'-UTR AES-mtRNR1 *in vivo* для липоплексов, содержащих в своем составе липосомы 2X3-DOPE 1:3+2% PEG. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Было продемонстрировано увеличение уровня сигнала для мышей, которым вводили липоплексы, содержащие в своем составе мРНК с комбинацией 5'UTR-4 – и 3'-UTR AES-mtRNR1, в 5 раз для временных точек более 48ч после момента введения препарата. Таким образом, для дальнейших экспериментов по выявлению наиболее оптимального состава липоплексов использовалась данная мРНК.

Наконец, мы проводили сравнительный анализ известных по литературным данным липосом 2X3-DOPE 1:3 и ранее не использовавшихся в исследованиях липосом 2X7-DOPE 1:3 на примере доставки мРНК с ранее заданной структурой (Рис. 13):

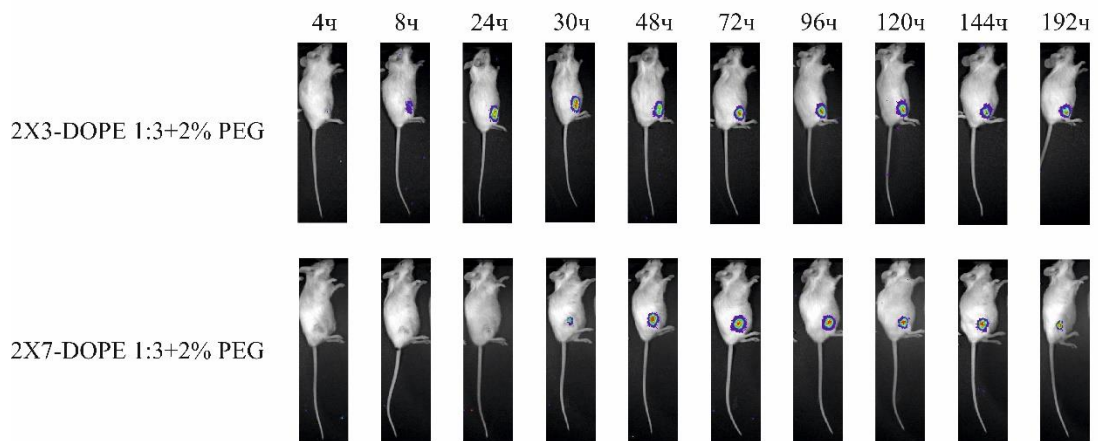
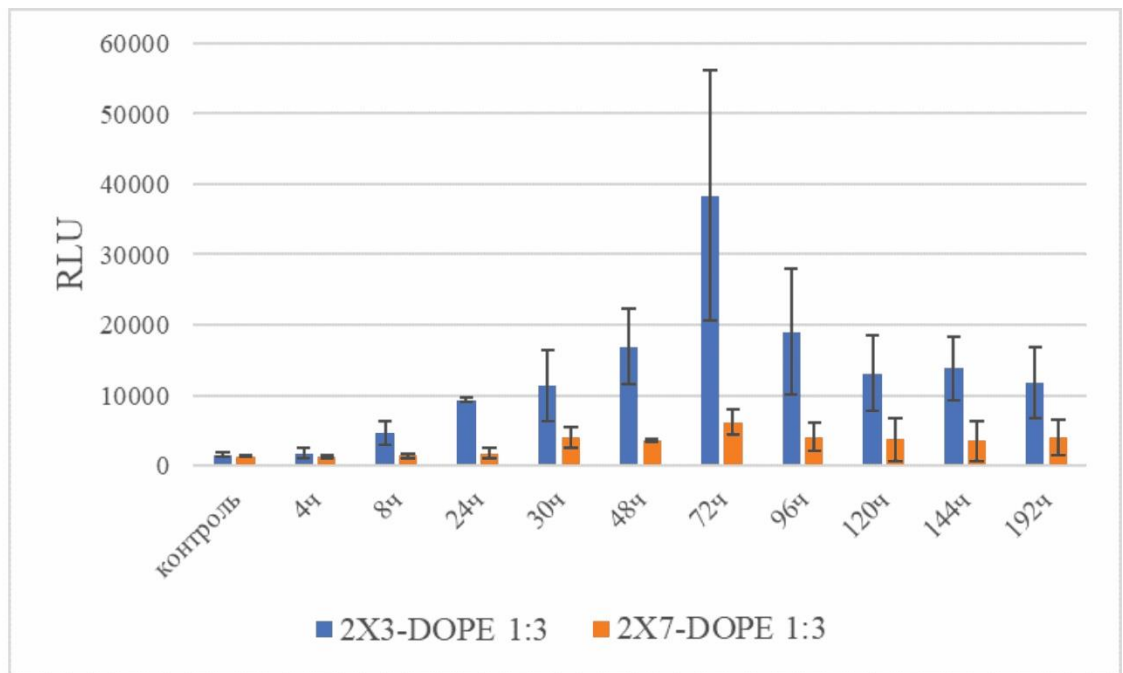


Рисунок 13. Сравнительный анализ доставки мРНК Luc2 *in vivo* для липоплексов, содержащих в своем составе липосомы 2X3-DOPE 1:2+2%PEG и 2X7-DOPE 1:3+2%PEG.

Было показано, что липосомы с основным липидом 2X7 позволяют производить доставку мРНК *in vivo* на уровне сравнимом с липосомами 2X3-DOPE.

Заключение

1. Определена структура репортерных мРНК, оптимальная для их трансляции в клетках млекопитающих. Показано, что включение в состав мРНК 5'- и 3'-нетранслируемых областей (UTR) увеличивает уровень трансляции репортерных мРНК в клетках человека в 2-3 раза, при этом UTR β -глобина демонстрируют меньшую эффективность в трансляции *in vitro* и *in vivo* по сравнению с комбинацией 5'UTR-4 и 3'UTR AES-mtRNR1, впервые использованная в данной работе.
2. Определены физико-химические характеристики катионных липосом 2X3-DOPE и 2X7-DOPE: размеры липосом составили 60-80 нм, а их дзета-потенциал варьируется в пределах +43 - +60 mV. Показано образование прочных комплексов липосом с РНК (липоплексов) при соотношениях N/P выше 4/1, при этом наблюдается увеличение заряда частиц и незначительное увеличение их размера в сравнении с изолированными липосомами. Для экспериментов *in vivo* показана необходимость наличия полиэтиленгликоля (PEG) в составе липидных частиц.
3. Определены оптимальная концентрация мРНК и липосом в составе липоплексов для трансфекции клеток человека. Высокий уровень сигнала наблюдается при концентрации мРНК более 2 мкг/мл клеточной среды и соотношении N/P выше 4/1. При этом для N/P более 8/1 в популяциях клеток наблюдается возрастающая цитотоксичность при высоком уровне доставки мРНК в клетки и высоком уровне ее экспрессии.
4. В экспериментах *in vivo* показана наибольшая эффективность липоплексов с соотношением основных липидов 2X3 и 2X7 к вспомогательному липиду DOPE в соотношении 1:3. Экспрессия мРНК Luc2 в месте внутримышечного введения наблюдается более 7 дней. При этом доставка мРНК с помощью липосом 2X3-DOPE позволяет получать повышенный сигнал по сравнению с доставкой с помощью 2X7-DOPE.

Список литературы

1. Zhuang X, Qi Y, Wang M, Yu N, Nan F, Zhang H, Tian M, Li C, Lu H, Jin N. mRNA Vaccines Encoding the HA Protein of Influenza A H1N1 Virus Delivered by Cationic Lipid Nanoparticles Induce Protective Immune Responses in Mice. *Vaccines (Basel)*. 2020, 8, 123.
2. Brödel AK, Sonnabend A, Roberts LO, Stech M, Wüstenhagen DA, Kubick S. IRES-mediated translation of membrane proteins and glycoproteins in eukaryotic cell-free systems. *PLoS One*. 2013, 8, e82234.
3. Liberman N, Gandin V, Svitkin YV, David M, Virgili G, Jaramillo M, Holcik M, Nagar B, Kimchi A, Sonenberg N. DAP5 associates with eIF2 β and eIF4AI to promote Internal Ribosome Entry Site driven translation. *Nucleic Acids Res*. 2015, 43, 3764-75.
4. Martinez-Salas E, Francisco-Velilla R, Fernandez-Chamorro J, Embarek AM. Insights into Structural and Mechanistic Features of Viral IRES Elements. *Front Microbiol.*, 2018, 8, 26-29.
5. Malone RW, Felgner PL, Verma IM. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989, 86, 6077-81.
6. Rinoldi C, Zargarian SS, Nakielski P, Li X, Liguori A, Petronella F, Presutti D, Wang Q, Costantini M, De Sio L, Gualandi C, Ding B, Pierini F. Nanotechnology-Assisted RNA Delivery: From Nucleic Acid Therapeutics to COVID-19 Vaccines. *Small Methods*. 2021, 15, 5, 2100402.
7. Whitehead K, Langer R., Anderson D. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2009, 8, 129–138.
8. Expression G., Sundaresan G., Gambhir S.S. Radionuclide Imaging of Reporter Gene Expression. *Brain Mapping: The Methods.*, 2002, 799–818.
9. Panova EA, Kleymenov DA, Shcheblyakov DV, Bykonina EN, Mazunina EP, Dzharullaeva AS, Zolotar AN, Derkaev AA, Esmagambetov IB, Sorokin II, Usachev EV, Noskov AN, Ivanov IA, Zatsepin TS, Dmitriev SE, Gushchin VA, Naroditsky BS, Logunov DY, Gintsburg AL. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A. *Front Immunol*. 2023, 14, 1098302.
10. Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, Plaschke A, Kranz LM, Fesser S, Diken M, Löwer M, Vallazza B, Beissert T, Bukur V, Kuhn AN, Türeci Ö, Sahin U. Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening. *Mol Ther*. 2019, 27, 824-836.

11. Yuzhakova D, Kiseleva E, Shirmanova M, Shcheslavskiy V, Sachkova D, Snopova L, Bederina E, Lukina M, Dudenkova V, Yusubalieva G, Belovezhets T, Matvienko D, Baklaushev V. Highly Invasive Fluorescent/Bioluminescent Patient-Derived Orthotopic Model of Glioblastoma in Mice. *Front Oncol.* 2022, 13, 897839.
12. Maslov, M.A.; Kabilova, T.O.; Petukhov, I.A.; Morozova, N.G.; Serebrennikova, G.A.; Vlassov, V.V.; Zenkova, M.A. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA. *J. Control. Release* 2012, 160, 182–193.
13. Puchkov PA, Kartashova IA, Shmendel EV, Luneva AS, Morozova NG, Zenkova MA, Maslov MA. Spacer structure and hydrophobicity influences transfection activity of novel polycationic gemini amphiphiles. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017, 27, 3284-3288.
14. Maslov, M.A.; Kabilova, T.O.; Petukhov, I.A.; Morozova, N.G.; Serebrennikova, G.A.; Vlassov, V.V.; Zenkova, M.A. Novel cholesterol spermine conjugates provide efficient cellular delivery of plasmid DNA and small interfering RNA. *J. Control. Release* 2012, 160, 182–193.
15. Markov, O.V.; Mironova, N.L.; Maslov, M.A.; Petukhov, I.A.; Morozova, N.G.; Vlassov, V.V.; Zenkova, M.A. Novel cationic liposomes provide highly efficient delivery of DNA and RNA into dendritic cell progenitors and their immature offsets. *J. Control. Release* 2012, 160, 200–210.
16. Kabilova, T.; Shmendel, E.; Gladkikh, D.; Morozova, N.; Maslov, M.; Chernolovskaya, E.; Vlassov, V.; Zenkova, M. Novel PEGylated liposomes enhance immunostimulating activity of is RNA. *Molecules* 2018, 23, 3101.
17. Mikheev, A.A.; Shmendel, E.V.; Zhestovskaya, E.S.; Nazarov, G.V.; Maslov, M.A. Cationic liposomes as delivery systems for nucleic acids. *Fine Chem. Technol.* 2020, 15, 7–27.
18. Vysochinskaya, V.; Shishlyannikov, S.; Zabrodskaya, Y.; Shmendel, E.; Klotchenko, S.; Dobrovolskaya, O.; Gavrilova, N.; Makarova, D.; Plotnikova, M.; Elpaeva, E.; et al. Influence of Lipid Composition of Cationic Liposomes 2X3-DOPE on mRNA Delivery into Eukaryotic Cells. *Pharmaceutics* 2023, 15, 8.
19. Kim J.K., Choi S.H., Kim C.O., Park J.S., Ahn W.S., Kim C.K. Enhancement of polyethylene glycol (PEG)-modified cationic liposome-mediated gene deliveries: effects on serum stability and transfection efficiency. *J Pharm Pharmacol.* 2003, 55, 453-60.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Антропов Денис Николаевич

Проверяющий: Гапонова Светлана Константиновна

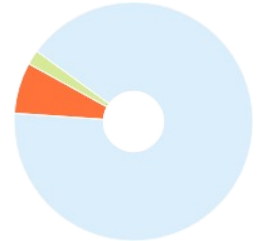
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 13
 Начало загрузки: 11.09.2023 10:07:24
 Длительность загрузки: 00:00:11
 Имя исходного файла:
 антропов_научный_доклад (2)_без
 ссылок.docx
 Название документа:
 антропов_научный_доклад (2)_без ссылок
 Размер текста: 29 кБ
 Символов в тексте: 29332
 Слов в тексте: 3750
 Число предложений: 167

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 11.09.2023 10:07:35
 Длительность проверки: 00:04:44
 Комментарии: не указано
 Поиск с учетом редактирования: да
 Проверенные разделы: титульный лист с. 1, основная часть с. 2-25
 Модули поиска: ИПС Адилет, Библиография, Сводная коллекция ЭБС, Интернет Плюс*, Сводная коллекция РГБ, Цитирование, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KkRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KyRu), Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Переводные заимствования (KkEn), Переводные заимствования (KyEn), Переводные заимствования издательства Wiley , eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, IEEE, Медицина, Диссертации НББ, Коллекция НБУ, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Перефразирования по Интернету, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Перефразирования по коллекции издательства Wiley , Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Шаблонные фразы, Кольцо вузов, Издательство Wiley, Переводные заимствования



СОВПАДЕНИЯ

6,6%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

0%

ЦИТИРОВАНИЯ

1,81%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

91,59%

Совпадения — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.

Самоцитирования — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.

Цитирования — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.

Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.

Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.

Оригинальный текст — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует полному тексту проверяемого документа.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	3,76%	3,76%	Дипломная работа Валитова Альмира	25 Мая 2023	Кольцо вузов	3	3	
[02]	1,91%	0,53%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс*	3	5	
[03]	1,62%	0,25%	Марчук, Сергей Вадимович Приме... http://dlib.rsl.ru	13 Сен 2013	Сводная коллекция РГБ	2	3	
[04]	1,5%	0,17%	Лебедева О.С. Автореферат http://vigg.ru	20 Авг 2017	Интернет Плюс*	1	4	
[05]	1,39%	1,39%	https://www.cell.com/molecular-therap... https://cell.com	30 Дек 2022	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	2	2	
[06]	1,26%	1,26%	Пояснительная записка к проекту Пр... http://ivo.garant.ru	18 Ноя 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	3	3	

[07]	1,26%	0%	Решение Советского районного суда ... http://arbitr.garant.ru	24 Сен 2016	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	3	
[08]	1,22%	0%	Приказ Министерства здравоохранен... http://ivo.garant.ru	31 Окт 2015	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	3	
[09]	1,22%	0%	Распоряжение Правительства РФ от 2... http://ivo.garant.ru	30 Июн 2022	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	3	
[10]	1,22%	0%	Постановление Правительства Новос... http://ivo.garant.ru	29 Дек 2019	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	0	3	
[11]	1,22%	0%	Разработка технологии оперативног... https://4science.ru	17 Сен 2019	Интернет Плюс*	0	3	
[12]	1,22%	0%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	03 Июн 2022	Интернет Плюс*	0	3	
[13]	1,22%	0,55%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	4	9	
[14]	1,19%	0%	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ИДИ... https://elibrary.ru	20 Дек 2022	eLIBRARY.RU	0	3	
[15]	1,19%	0%	ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ Ф... https://elibrary.ru	31 Дек 2019	eLIBRARY.RU	0	3	
[16]	1,15%	0%	Аршакян, Вардан Арамаисович План... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2013	Сводная коллекция РГБ	0	3	
[17]	1,15%	0%	Костькина, Яна Михайловна Профила... http://dlib.rsl.ru	13 Сен 2013	Сводная коллекция РГБ	0	3	
[18]	1,15%	0%	РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИ... http://elibrary.ru	01 Янв 2017	eLIBRARY.RU	0	3	
[19]	1,15%	0%	132546618.pdf https://core.ac.uk	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	3	
[20]	1,15%	0%	YakovlevaNV.pdf (1/2) http://vak2.ed.gov.ru	10 Фев 2016	Интернет Плюс*	0	3	
[21]	1,08%	0%	Пьянков, Степан Александрович Имм... http://dlib.rsl.ru	12 Янв 2021	Сводная коллекция РГБ	0	3	
[22]	1,08%	0%	ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ... https://elibrary.ru	15 Июл 2022	eLIBRARY.RU	0	3	
[23]	1,04%	0%	РНФ подвел итоги первых конкурсов ... http://sib-science.info	18 Сен 2019	Интернет Плюс*	0	6	
[24]	1,04%	0%	https://istina.msu.ru/media/publication... https://istina.msu.ru	04 Сен 2022	Интернет Плюс*	0	3	
[25]	1,04%	0%	http://www.vector.nsc.ru/userfiles/files/... http://vector.nsc.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	3	
[26]	1,02%	0,5%	О ПРИСУЖДЕНИИ ПРЕМИЙ ПРАВИТЕ...	15 Янв 2019	СМИ России и СНГ	1	1	
[27]	1,01%	0%	Медицинский алфавит 26 / 2017, том 3... https://docplayer.ru	12 Сен 2019	Интернет Плюс*	0	4	
[28]	0,84%	0%	Ультразвуковая и функциональная д... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,8%	0%	Всероссийская научно-практическая ... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	0,8%	0%	Артериальная гипертония у лиц приз... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,8%	0%	Т. XCIV, № 4, июль-август http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	0,8%	0%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,8%	0%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	0,8%	0%	Генетика. 2017. Т. 53, № 8 http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	0,78%	0%	Научно-технологическая проектная ... https://sochisirius.ru	14 Авг 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	0,73%	0%	ЧАСТОТА НОСИТЕЛЬСТВА КЛИНИЧЕС... https://e.lanbook.com	22 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,73%	0%	Кому и где делают тест на коронавир... https://iskitim.bezformata.com	22 Мая 2020	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,65%	0%	https://www.mcb.nsc.ru/sites/mcb.nsc.r... https://mcb.nsc.ru	14 Июл 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,59%	0%	"Ленпромэкспертиза" - экспертные ус... http://linkstars.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,55%	0%	http://www.solid.nsc.ru/upload/iblock/... http://solid.nsc.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[41]	0,54%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	03 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,53%	0%	Способ получения наноразмерной с... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	0,53%	0%	Способ очистки вируса осповакцины ... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,53%	0%	Средство для нейтрализации вируса н... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,53%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	04 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,53%	0%	Т. 2 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	0,53%	0%	Теоретические основы новых направ... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,53%	0%	Interpretation of radioimpedance soun... https://ieeexplore.ieee.org	04 Ноя 2013	IEEE	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,53%	0%	253573 http://biblioclub.ru	19 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,53%	0%	Джаксыбаев Арыстан.16-111	08 Июн 2023	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,53%	0%	Экраны электромагнитного излучени... http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,53%	0%	Поздравляем директора Российско-а... http://barnaul.bezformata.com	17 Авг 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,53%	0%	Технология микроволнового обезво... http://diss.natlib.uz	23 Июл 2021	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,53%	0%	Исследование интеллектуализации эл... http://diss.natlib.uz	07 Сен 2021	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,43%	0%	Влияние аналогов малых ядрышковы... http://earthpapers.net	04 Июл 2016	Интернет Плюс*	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,36%	0%	Противоопухолевое средство тритер... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,27%	0%	Чунков, Магомед Магомедрасулович... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,27%	0%	Разработка и исследование метода ф... http://diss.natlib.uz	29 Авг 2014	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,27%	0%	Разработка и исследование метода ф... http://diss.natlib.uz	29 Авг 2014	Коллекция НБУ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,27%	0%	https://www.gubkin.ru/diss2/files/d4-M... https://gubkin.ru	13 Янв 2022	Интернет Плюс*	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,26%	0%	Получение, характеристика и примен... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Антропов Денис Николаевич

«Разработка систем детекции нуклеиновых кислот и регуляция экспрессии генов с использованием белков геномного редактирования семейства Cas»

Оригинальность работы составляет 91.59%, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Гапонова